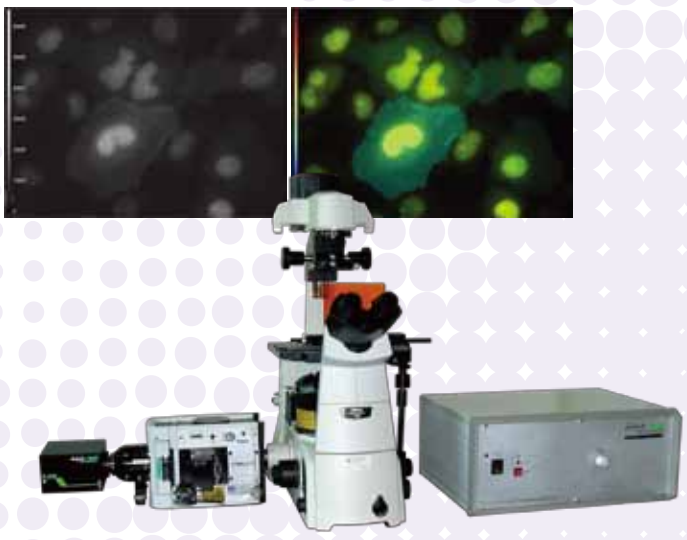
FLIM（*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*）

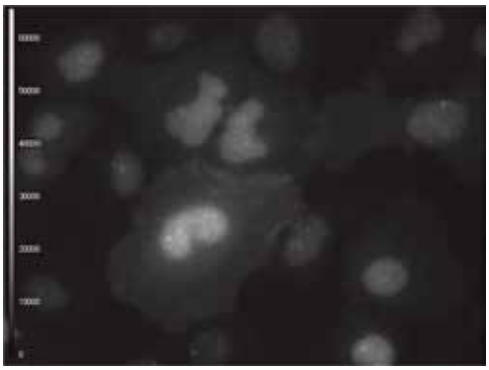
蛍光寿命イメージング

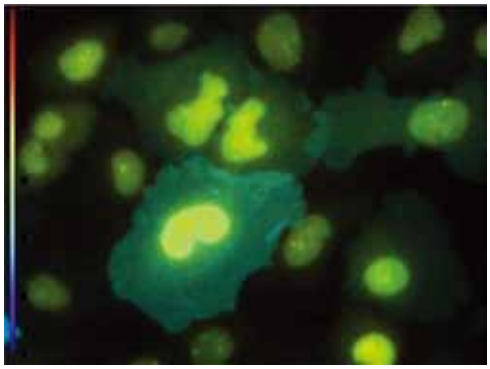
LIFA



クイエルフイ株式会社

なぜ「FLIM」蛍光寿命イメージングなのか?





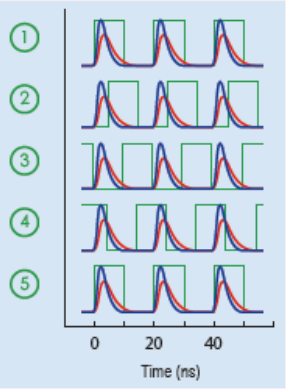
蛍光分子は、励起すると光を放出しますが、その光はその励起状態の減衰率に応じた時間で指数関数的に減衰します。それを蛍光寿命と言いますが、蛍光寿命が分かれば各分子やその周囲環境について知ることができます。蛍光寿命測定法(FLIM)は、生きた細胞や無機材料の寿命の空間的分布をマッピングする技術です。蛍光寿命測定法の主な長所は、濃度やブリーチング(蛍光の永久破壊)、発光強度のばらつきなどの影響を受けないという、定量的に優れた手法であるという点です。

細胞生物学や薬学の世界では、FLIMは幅広い生物物理現象のイメージング技術として使用されています。たとえば、FLIMを使用すれば、酸素のイメージングやイオンのイメージング、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によるたんぱく質間の相互作用のイメージングなどが可能になります。FRETは、ドナー側の蛍光分子と、ドナー側分子の寿命を減衰するアクセプター側分子の間で起こるエネルギー伝達の非放射プロセスです。この変化をFLIMで定量的に計測し、分子間の相互作用や分子の立体構造の変化をナノスケールで数量化します。

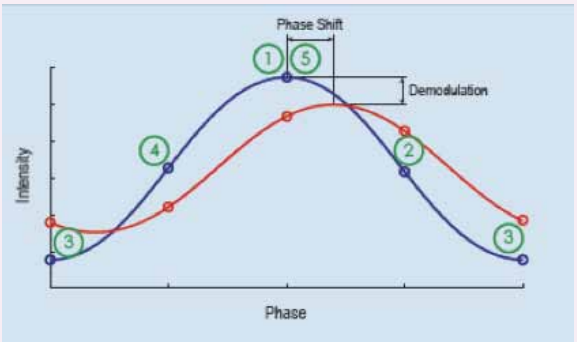
テクノロジー

周波数領域蛍光寿命イメージング

周波数領域蛍光寿命イメージングでは、パルス光源(左図の青色曲線)と変調されたICCDカメラ(左図、緑色曲線)を使用することにより、短時間で試料の蛍光寿命が得られます。蛍光減衰により、試料からの蛍光発光(左図、赤色曲線)は、時間領域において位相シフトし振幅が減少します。励起と検出の両方において同じ周波数が使用され、またカメラの様々な位相設定(図の1~5)において一連の蛍光発光の画像が撮影されます。これにより、画像の各画素の周波数領域における相互相関関数(右図、赤色曲線)が得られます。発光画像の強度は、検出器の感度が蛍光発光の位相と部分的に同位相である(例の2と4)か完全に同位相である(例の1と5)かによって変わります。



この関数によって、時間領域において蛍光発光の位相シフトと復調が正確に反映されます。この2つのパラメータは、画素ごとに寿命値に換算することができます。この周波数混合手法は、無線技術の基盤であり、その利便性と容易性、ノイズ抑制力の高さでよく知られています。この蛍光寿命は、最新式のICCDカメラを使うことにより、視野内のすべての画素について同時に得られます。



LIFA: 周波数領域FLIM

LIFAは、周波数領域高速蛍光／リン光寿命イメージング用カメラ式FLIMシステムであり、ライカ®、ニコン®、オリンパス®とツァイス®の蛍光顕微鏡に対応しています。安定したホモダイン検出技術と、TRiCAM変調カメラが提供するパラレル検出により、高精度な全視野寿命画像をほぼ瞬時に取得することができます。

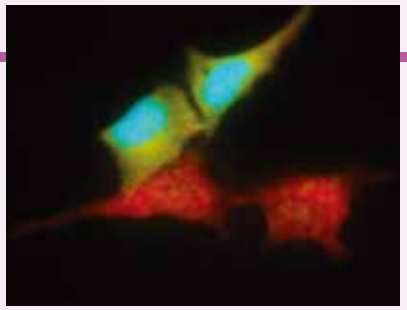
LIFAは、カメラ式システムであるため、生きた細胞のイメージングに特に適しています。標準の広視野システムには、幅広い周波数領域にわたって変調することができる高出力LED付マルチLED変調光源が装備されており、高い寿命感度を提供します。マルチレーザーエンジンを使用しているため、全反射照明蛍光寿命画像顕微法（TIRF-FLIM）には全内部反射蛍光（TIRF）、そして共焦点蛍光寿命画像顕微法（共焦FLIM）にはマルチビーム共焦点スピニングディスクと、簡単に組み合わせることができます。LIFAのその他の主要構成部品には、TRiCAM変調ICCDカメラ、変調制御ユニット、LI-FLIMソフトウエアパッケージがあります。TRiCAMには、それぞれのアプリケーションに合わせて、最新のGENIIまたはGENIIIイメージインテンシファイアを装備することができます。Lambert InstrumentsのLIFAは、据付も操作も簡単です。オープン·アキテクチャであるため、ハイコンテンツスクリーニングアプリケーションに特に適しています。LIFAシステムは、適応光学FLIM-FRET調査に「簡単かつ定量的」であると評価されています。

主な特徴

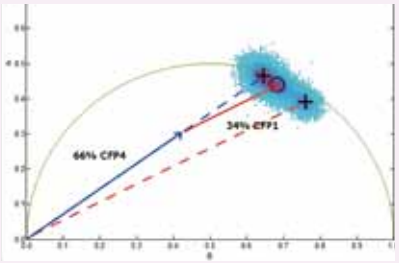
周波数領域 FLIM:	手動式から高度自動式のものまで、広視野蛍光顕微鏡上で使用可能。
高速取得:	1秒あたりに複数の寿命画像を取得でき、生きた細胞を計測するアプリケーションに便利。
高いカスタマイズ性:	TIRF、共焦点スピニングディスク、異方性、ハイパースペクトルシステム に対応。
低励起強度:	光毒性を低減。
広い寿命領域:	数ピコ秒から1ミリ秒まで。
極座標表示:	寿命成分の区別とFRET効率の回復のため。
広範なソフトウエアパッケージLI-FLIM:	単一周波数、多周波数、低速度撮影、極座標表示、マルチ寿命成分フィットなど。

解析

詳しく解析する場合は、周波数領域寿命データを指数関数成分に分解することができます。別の一般的な方法としては、測定された位相シフトと復調を単一のグラフにプロットするというものがあります。この極座標表示（フェーザ表示）を用いると、各画素における蛍光減衰を直接的かつ全体的にとらえることができます。極座標表示では、複数の分子種の存在や蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の発生は、指数関数を用いた蛍光減衰の非線形フィッティングを行うのと比較して、通常特定領域におけるデータ·クラスタリングとして認識されています。極座標表示解析は瞬時に行われ、FLIMを分光学やデータ解析の専門家以外にも分かりやすいものにします。



CFP1とCFP4の局所的発現を示す細胞、ならびにそれに対応する極座標表示。T.W.J. Gadella教授（アムステルダム自由大学（オランダ））提供。



アプリケーション

分子相互作用

蛋白質立体構造

バイオセンサー

酸素イメージング

NADH/FAD 蛍光ダイナミクス

粘度イメージング

膜ダイナミクス

膜輸送

LED 検査

原油特性分析

太陽電池 MCL 監視

LIFA 構成部品

- TRiCAM変調ICCDカメラ
- マルチレーザーまたはマルチLED光源
- コントロールユニット（変調信号発生器および高電圧電源を含む）
- LI-FLIMソフトウエアパッケージ
- USB2.0インターフェイス
- パソコンおよび24インチモニタ
- 据付、トレーニングおよびサポート

LIFA 仕様

寿命領域	0 ～ 300ns（LIFA） 0 ～ 1ms（LIFA-X） 300ns ～ 1ms（LIFA-P）
寿命分解能	80ps 単画素 *
寿命ドリフト	30ps 未満 *
変調周波数	1 ～ 120MHz（LIFA）/ 0.1KHz ～ 120MHz（LIFA-X）/ 0.1KHz ～ 100KHz（LIFA-P）
速度	2 フルフレーム寿命画像 / 秒
変調時空間分解能	26lp/mm または約 400nm FWHM（100x 対物レンズ）
感度	単一光子
検出領域（GENII, S20）	200 ～ 600nm
検出領域（GENII, S25）	450 ～ 850nm
検出領域（GENIII、GaAs、GaAsP）	450 ～ 900nm
イントラシーンダイナミックレンジ	12 ビット
カメラ視野	14.4 x 10.8mm
カメラ CCD 画素レイアウト（H x W）	1392 x 1040 ピクセル
有効画素寸法	10.3 平方ミクロン
カメラマウント	C マウント 1x
測定波長範囲（マルチ LED）	350 ～ 800nm（540 ～ 580nm を除く）
測定波長範囲（マルチレーザー）	375-515nm、635-785nm（特別仕様あり）
TRiCAM 寸法（L x W x H）	133 x 116 x 80mm
コントロールユニット寸法（L x W x H）	470 x 420 x 200mm
マルチ LED 寸法（L x W x H）	346 x 109 x 183mm
マルチレーザー寸法（L x W x H）	480 x 484 x 88mm（小型モデル）

※広視野FLIM用LIFAマルチLED。LIFAコンフォーカル（共焦点）、LIFA TIRF、LIFA-X製品の詳細仕様については、弊社セールスまたはサポートチームまでお問い合わせください。
※可能な構成の詳細な技術仕様については、弊社までお問い合わせください。

Lambert INSTRUMENTS
PERFECTION IN IMAGE DETECTION

KLV CO., LTD.
〒101-0041 東京都千代田区神田須田町1-2
TEL：03-3258-1238（代） FAX：03-3258-5689
URL：www.klv.co.jp E-mail：toiawase@klv.co.jp

ご注意
- 正しく安全にお使いいただくために、ご使用の前に必ず「取扱説明書」をお読みください。
- 製品改良のため、仕様・デザインは予告なく変更する場合がございます。
- 製品の色は印刷物ですので、実際の色と異なる場合がございます。
- このカタログの記載内容は、改良のため予告なく変更する場合がございますので、ご了承ください。

■代理店